Aus der Hautklinik der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. Dr. A. Greither

VERGLEICH ZWEIER CO_2-ENTWICKLER UND DER EINFLUSS DER INKUBATIONSTEMPERATUR AUF DAS ANZÜCHTVERHALTEN VON NEISSERIA GONORRHOEAE ANHAND EINES RATIONELLEN KULTURVERFAHRENS

DISSERTATION
zur
Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von
WILHELM L. HUNLOH
1982

RIJKS-
UNIV.
LEIDEN

Aus der Hautklinik der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. Dr. A. Greither

VERGLEICH ZWEIER CO_2-ENTWICKLER UND DER EINFLUß DER INKUBATIONSTEMPERATUR AUF DAS ANZÜCHTVERHALTEN VON NEISSERIA GONORRHOEAE ANHAND EINES RATIONELLEN KULTURVERFAHRENS

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Wilhelm L. Hunloh
1982

"Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf"

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. H. Brüster

Referent:

gez.: Prof. Dr. Z. Itani

Korreferent:

gez.: Prof. Dr. L. Grün

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538101_0058

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. EINLEITUNG 1

2. EIGENE UNTERSUCHUNGEN 3

2.1. Patientengut 3
2.2. Auswahl der Patienten 3
2.3. Geschlechtsverteilung 4
2.4. Altersverteilung 4

3. MATERIAL UND METHODE 6

3.1. Substanzen 6
3.2. Geräte 6
3.3. Nährboden 6
3.4. Kulturbeimpfung und Inkubation 7

4. ERGEBNISSE 9

5. DISKUSSION 22

5.1. Allgemeine Vorbemerkung 22
5.2. Zur Auswahl des Patientenguts 23
5.3. Zur Geschlechtsverteilung 23
5.4. Zum Vergleich der CO_2-Entwickler 23
5.5. Zum Temperatureinfluß auf das Wachstum der Neisserienkolonien 27

6. ZUSAMMENFASSUNG 30

7. LITERATUR 31

DANKSAGUNGEN

LEBENSLAUF

1. EINLEITUNG

Die Gonorrhoe ist die häufigste venerische Erkrankung in der Welt. In einem Bericht der Vereinten Nationen wurde 1967 geschätzt, daß 30 bis 50 Millionen Syphiliserkrankungen über 150 Millionen Fälle von Gonorrhoe gegenüberstehen (3).

In Belgien nimmt sie den zweiten Platz in der Liste der anzeigepflichtigen Erkrankungen nach der Tuberkulose ein (14), in den USA ist sie sogar die häufigste den Gesundheitsbehörden gemeldete Infektionskrankheit (26). In den Jahren 1969/70 erreichte in Schweden die Zahl der an Gonorrhoe Erkrankten einen Höchststand von 40.000 pro Jahr (40).

In der dermato-venerologischen Praxis dürfte auch heute noch in der Mehrzahl der Fälle der anamnestisch erhebbare klinische Verlauf und die Abstrichmikroskopie nach Durchführung einer Färbung nach Gram über Diagnosestellung und Therapie einer Gonorrhoe entscheiden. Es ist jedoch zu fordern, daß der kulturelle Nachweis von Neisseria gonorrhoeae erbracht wird (22).

Die Kultivierung von Neisserien ist wegen der erschwerten Anzüchtbarkeit dieser Keime auf nicht spezifischen Nährböden und in aerober Atmosphäre in der Regel Kliniken oder Speziallaboratorien vorbehalten, die über entsprechende Einrichtungen, wie der Inkubationsmöglichkeit in CO_2-begasten Brutschränken, verfügen. Über Transportmedien kann

diese diagnostische Lücke in befriedigendem Maße geschlossen werden.

Neben zum Teil recht aufwendigen und teuren Kultivierungsverfahren, etwa zur Herstellung von Neisserien-Zellsubkulturen für mikrobiologische Fragestellung (18), oder Flüssigmedien (15, 24), wurde eine Reihe von Nährmedien entwickelt, die recht einfach und preiswert in der Herstellung und im Gebrauch sind und für die Diagnostik verwertbare Ergebnisse erzielen (1, 7, 27, 38, 39).

Anhand des von ITANI beschriebenen Verfahrens (23), das bei der kulturellen Diagnostik der Gonorrhoe in der Universitäts-Hautklinik Düsseldorf Anwendung findet, soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, welchen Einfluß die Lagerung der Kulturen bei Raumtemperatur auf das anschließende Inkubationsergebnis hat, und die CO_2-Entwicklung mit GasPak^R und einem selbst hergestellten einfachen CO_2-Entwickler verglichen werden.

Nicht untersucht werden sollen:

a) der Vergleich der angegebenen Methode mit anderen mikrobiologischen Verfahren in bezug auf die diagnostische Treffsicherheit,

b) das anschließende Fermentationsergebnis der verwendeten Proben, um mit Sicherheit Neisseria gonorrhoeae nachzuweisen,

c) der Therapieerfolg einer durchgeführten Behandlung.

2. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

2.1. PATIENTENGUT

Die Untersuchung umfaßt 74 Patienten, die vom 1.1.1977 bis zum 31.10.1980 in der Hautklinik der Universität Düsseldorf wegen akuter Gonorrhoe behandelt wurden.

2.2. AUSWAHL DER PATIENTEN

Für die nachstehende Untersuchung wurde nur Neisserien-haltiges Material von Patienten verwendet, die wegen akuter eitriger Urethritis im Rahmen der ambulanten Notfallversorgung untersucht und behandelt wurden. Bei weiblichen Patienten wurde das Portio-Sekret verwendet.

Nicht in die Untersuchung gingen Fälle von chronischer und fraglicher Gonorrhoe ein, weil bei diesen Patienten keine ausreichende Menge an Urethralsekret für die Untersuchungsreihe zur Verfügung stand. Material von Patienten, die vor- oder nachbehandelt waren, wurde in diesem Rahmen nicht untersucht.

Die Untersuchung der nach Gram gefärbten Abstrichpräparate mußte die vorläufige Diagnose sichern.

2.3. GESCHLECHTSVERTEILUNG

	n	%
männlich	68	91.9
weiblich	6	8.1
gesamt	74	100.0

Tab. 1:
Geschlechtsverteilung.

2.4. ALTERSVERTEILUNG

Die 74 Patienten können folgenden Altersgruppen zugeordnet werden:

Altersgruppe (Jahre)	n	%
10 - 14	2	2.7
15 - 19	7	9.5
20 - 24	24	32.4
25 - 29	15	20.3
30 - 34	11	14.9
35 - 39	10	13.5
40 - 44	4	5.4
über 45	1	1.3

Tab. 2:
Altersverteilung.

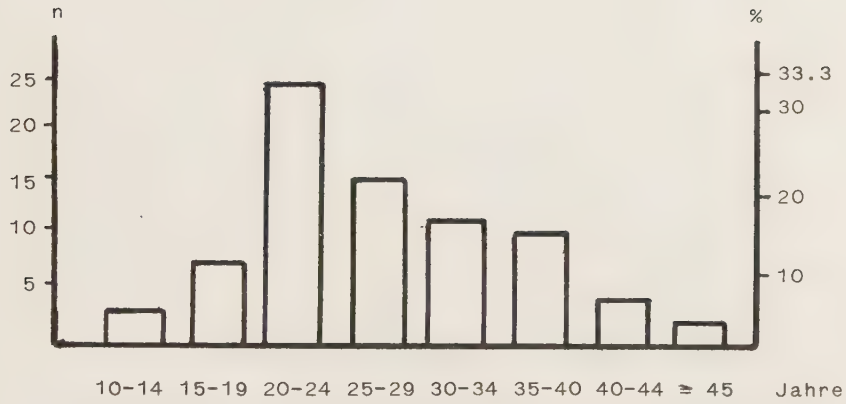


Abb. 1:
Graphische Darstellung der Altersverteilung.

3. MATERIAL UND METHODE

3.1. SUBSTANZEN

OXOID G.C. Agar Base Code CM 367, Firma Oxoid Deutschland

OXOID Soluble Hemoglobin Powder, Firma Oxoid Deutschland Code L 53

OXOID Sterile G.C. Supplement, Firma Oxoid Deutschland Code SR 56

GasPak-Tablette (BBL) Nr. 70308

Natriumcitrat (Merck) Nr. 6432

Natriumhydrogencarbonat (Merck) Nr. 6329 E

1,4-Phenylendiamin (Merck) Nr. 807246

3.2. GERÄTE

Autoklav

Kühlschrank

Brutschrank

Sterile Stuhlröhrchen ohne Löffelchen, Volumen 25 ml (Firma W. Sarstedt)

3.3. NÄHRBODEN

Der Nährboden wurde nach Herstellerangabe angefertigt. Etwa 8 ml des Nährbodens wurde in schräggestellte sterile Stuhlröhrchen gebracht und bis zum Erkalten stehengelassen. Diese wurden im Kühlschrank bei 4 bis 8 ^{o}C gelagert. Vor Gebrauch wurden die Röhrchen auf Zimmertemperatur erwärmt.

3.4. KULTURBEIMPFUNG UND INKUBATION

Bei 74 Patienten mit mikroskopisch gesicherter Gonorrhoe wurden jeweils 15 Nährböden mittels einer sterilen Drahtöse mit Neisserien-haltigem Urethralsekret beimpft. Die Kulturröhrchen wurden in fünf Gruppen eingeteilt.

Das erste Röhrchen jeder Gruppe erhielt keinen CO_2-Entwickler-Zusatz, das zweite wurde mit ca. 200 mg eines Natriumhydrogencarbonat-Natriumcitrat-Gemisches (Mischungsverhältnis 1 : 1) versetzt und in das dritte wurde ein etwa hirsekorngroßes GasPak^R-Stück (etwa 30 mg) gebracht.

Die Röhrchen wurden verschlossen und gruppenweise inkubiert:

Gruppe 1 wurde 24 h bei 37°C,
Gruppe 2 wurde 24 h bei Raumtemperatur (21°C),
Gruppe 3 wurde 24 h bei Raumtemperatur und anschließend weitere 24 h bei 37°C,
Gruppe 4 wurde 48 h bei Raumtemperatur und
Gruppe 5 wurde 48 h bei Raumtemperatur und anschließend weitere 24 h bei 37°C

inkubiert.

Die Neisseria-Kulturen wurden nach Ende der festgelegten Bebrütungszeit gruppenweise eine Minute lang mit einer gesättigten 1,4-Phenylendiaminlösung überschichtet. Anschließend wurde die Entwicklerlösung vorsichtig dekantiert und nach weiteren 30 Sekunden der Ausfall der Peroxidasereaktion abgelesen. Neisserien-Kolonien nahmen eine schwarz-braune Farbe an.

Unterschieden wurden:

Gradation I = ausgedehnte peroxidase-positive Koloniebildung
Gradation II = mäßige peroxidase-positive Koloniebildung
Gradation III = vereinzelte peroxidase-positive Koloniebildung
negativ = keine peroxidase-positiven Kolonien.

Aufgrund der geringen Fallzahlen wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet und Prozentangaben erstellt.

4. E R G E B N I S S E

	OHNE CO_2-ENTWICKLER:	
	negativ: 27 = 36,5 %	
gesamt:	74 = 100 %	I: 20 = 27,0 %
	positiv: 47 = 63,5 %	II: 13 = 17,6 %
		III: 14 = 18,9 %
	MIT CITRAT-BICARBONAT-GEMISCH:	
	negativ: 9 = 12,2 %	
gesamt:	74 = 100 %	I: 47 = 62,7 %
	positiv: 65 = 87,8 %	II: 15 = 20,3 %
		III: 3 = 4,1 %
	MIT GASPAK^R:	
	negativ: 2 = 2,7 %	
gesamt:	74 = 100 %	I: 63 = 85,1 %
	positiv: 72 = 97,3 %	II: 5 = 6,8 %
		III: 4 = 5,4 %

Tab. 3:
Ergebnisse der Gruppe 1
24 h bei 37°C (s. S. 7)

	OHNE CO_2-ENTWICKLER:	
	negativ: 70 = 94,6 %	
gesamt:	74 = 100 %	I: 1 = 1,3 %
	positiv: 4 = 5,4 %	II: 0 = 0,0 %
		III: 3 = 4,1 %
	MIT CITRAT-BICARBONAT-GEMISCH:	
	negativ: 68 = 91,9 %	
gesamt:	74 = 100 %	I: 0 = 0,0 %
	positiv: 6 = 8,1 %	II: 1 = 1,3 %
		III: 5 = 6,7 %
	MIT GASPAK^R:	
	negativ: 62 = 83,8 %	
gesamt:	74 = 100 %	I: 0 = 0,0 %
	positiv: 12 = 16,2 %	II: 2 = 2,7 %
		III: 10 = 13,5 %

Tab. 4:
Ergebnisse der Gruppe 2
24 h bei 21°C (s. S. 7)

	OHNE CO_2-ENTWICKLER:	
	negativ: 54 = 73,0 %	
gesamt:	74 = 100 %	I: 4 = 5,4 %
	positiv: 20 = 27,0 %	II: 10 = 13,5 %
		III: 6 = 8,0 %
	MIT CITRAT-BICARBONAT-GEMISCH:	
	negativ: 27 = 36,5 %	
gesamt:	74 = 100 %	I: 5 = 6,8 %
	positiv: 47 = 63,4 %	II: 21 = 28,3 %
		III: 21 = 28,3 %
	MIT GASPAK^R:	
	negativ: 13 = 17,6 %	
gesamt:	74 = 100 %	I: 17 = 23,0 %
	positiv: 61 = 82,4 %	II: 27 = 36,4 %
		III: 17 = 23,0 %

Tab. 5:
Ergebnisse der Gruppe 3
24 h bei 21°C und anschließend 24 h bei 37°C (s. S. 7)

	OHNE CO_2-ENTWICKLER:	
	negativ: 65 = 87,8 %	
gesamt:	74 = 100 %	I: 0 = 0,0 %
	positiv: 9 = 12,2 %	II: 2 = 2,7 %
		III: 7 = 9,5 %
	MIT CITRAT-BICARBONAT-GEMISCH:	
	negativ: 66 = 89,2 %	
gesamt:	74 = 100 %	I: 1 = 1,3 %
	positiv: 8 = 10,8 %	II: 3 = 4,1 %
		III: 4 = 5,4 %
	MIT GASPAK^R:	
	negativ: 61 = 82,4 %	
gesamt:	74 = 100 %	I: 1 = 1,3 %
	positiv: 13 = 17,6 %	II: 2 = 2,7 %
		III: 10 = 13,6 %

Tab. 6:
Ergebnisse der Gruppe 4
48 h bei 21°C (s. S. 7)

	OHNE CO_2-ENTWICKLER:	
	negativ: 61 = 82,4 %	
gesamt:	74 = 100 %	I: 1 = 1,3 %
	positiv: 13 = 17,6 %	II: 3 = 4,1 %
		III: 9 = 12,2 %
	MIT CITRAT-BICARBONAT-GEMISCH:	
	negativ: 55 = 74,3 %	
gesamt:	74 = 100 %	I: 1 = 1,3 %
	positiv: 19 = 25,7 %	II: 8 = 10,8 %
		III: 10 = 13,6 %
	MIT GASPAK^R:	
	negativ: 44 = 59,5 %	
gesamt:	74 = 100 %	I: 4 = 5,4 %
	positiv: 30 = 40,5 %	II: 9 = 12,2 %
		III: 17 = 22,9 %

Tab. 7:
Ergebnisse der Gruppe 5
48 h bei 21°C und anschließend 24 h bei 37°C (s. S. 7)

In den folgenden graphischen Darstellungen der Tabellen 3 bis 7 stehen

O für die Kulturröhrchen, die mit keinem CO_2-Entwickler inkubiert wurden,

BC für das verwendete Citrat-Bicarbonat-Gemisch,

GP für GasPak^R.

Die Inkubationszeiten und -temperaturen der Gruppen 1 bis 5 wurden bereits auf S. 7 dargelegt.

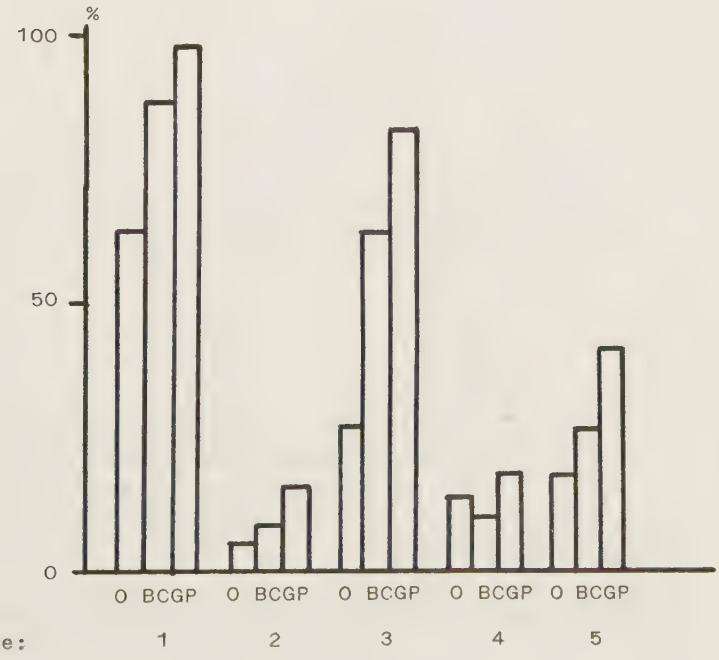


Abb. 2:
Die prozentuale Darstellung der positiven Kulturergebnisse.

Die Abb. 2 verdeutlicht, daß mit GasPak^{R} inkubierte Kulturröhrchen bei unterschiedlichen Temperaturverhältnissen und Inkubationszeiten zum Teil recht eindeutige Vorteile für den Erhalt einer positiven Kultur im Vergleich zu den unter aeroben Verhältnissen und mit Citrat-Bicarbonat-Gemisch inkubierten Röhrchen boten.

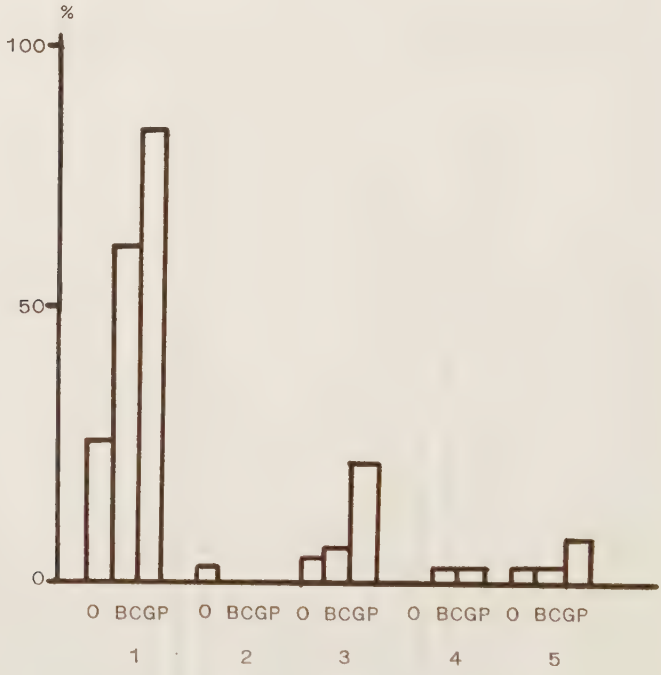


Abb. 3:
Die prozentuale Darstellung der positiven Kulturergebnisse der Gradation I (ausgedehnte Koloniebildung).

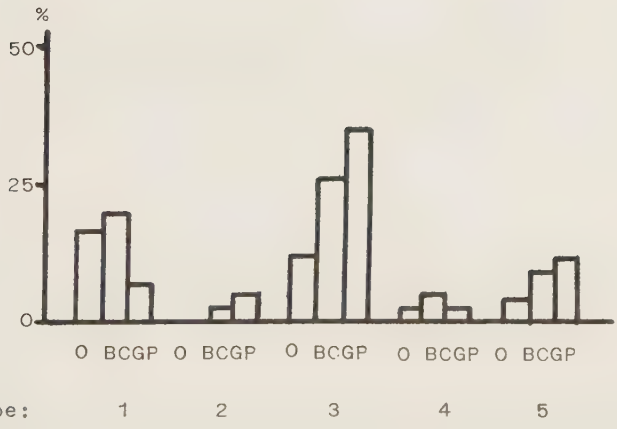


Abb. 4:
Die prozentuale Verteilung der positiven Kulturergebnisse der Gradation II (mäßige Koloniebildung).

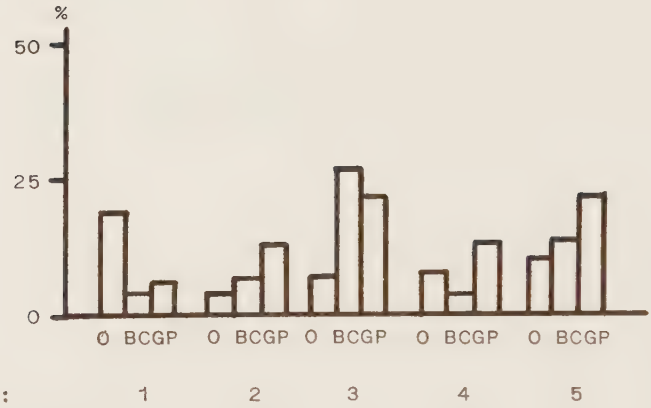


Abb. 5:
Die prozentuale Verteilung der positiven Kulturergebnisse der Gradation III (vereinzelte Koloniebildung).

Aus den Abb. 2 bis 5 (S. 14 bis 17) läßt sich ersehen, daß eine 24stündige Lagerung der beimpften Röhrchen sowohl eine nicht unerhebliche Einbuße an positiven Ergebnissen als auch einen Rückgang der Wachstumsintensität der Neisserienkolonien verursacht.

Die folgenden Abb. 6 bis 8 zeigen die Abhängigkeit der Neisserienkulturen von der Inkubationstemperatur auf (S. 18 ff).

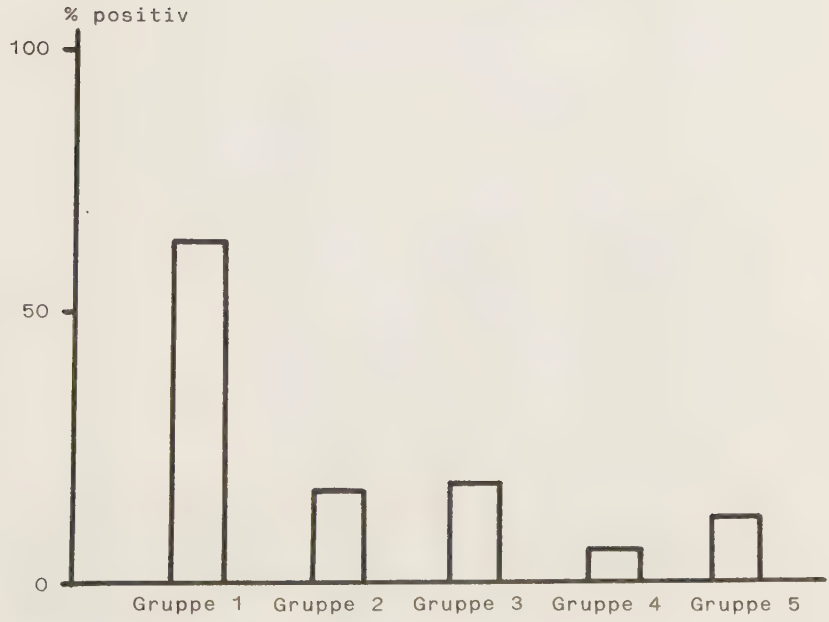
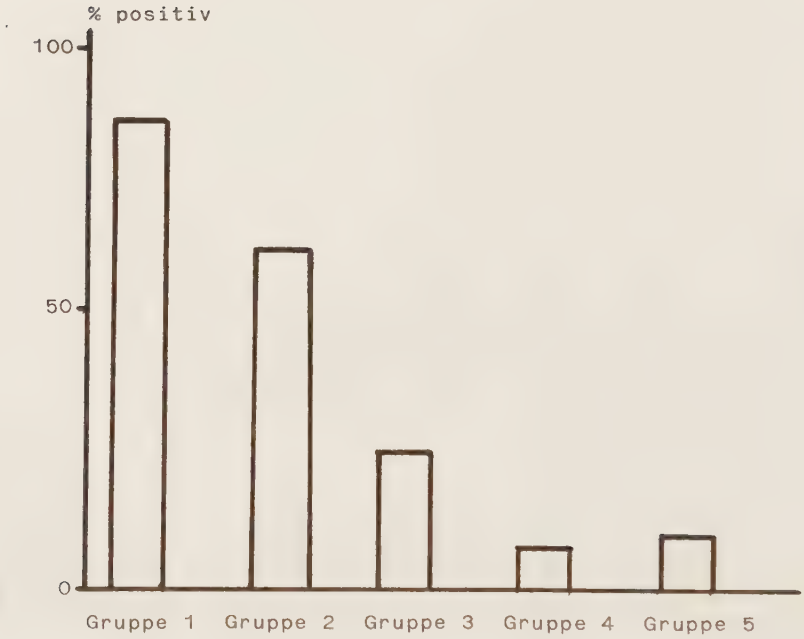


Abb. 6:
Prozentuale Ergebnisse ohne Zusatz eines CO_2-Entwicklers.

Unter aeroben Bedingungen ist das Wachstum von Neisserien gering, jedoch zeigten immerhin knapp zwei Drittel (63,5 %) der bei 37°C gelagerten Röhrchen eine positive Peroxidasereaktion.



Abb, 7:
Kulturergebnisse bei Zusatz von Citrat-Bicarbonat-Mischung.

Bereits bei einer Lagerungszeit von 24 h bei Raumtemperatur mit einer anschließenden Inkubation von 24 h bei 37°C sinkt die diagnostische Aussagekraft erheblich ab. Waren bei sofortiger Brutschrankinkubation immerhin noch 87,8 % der Proben erfolgreich kultivierbar, so sank der Anteil der positiven Ergebnisse in der Gruppe 3 auf 63,4 %. Ohne Bebrütung bei 37°C (Gruppen 2 und 4) lagen die Angehraten nicht über 11 %.

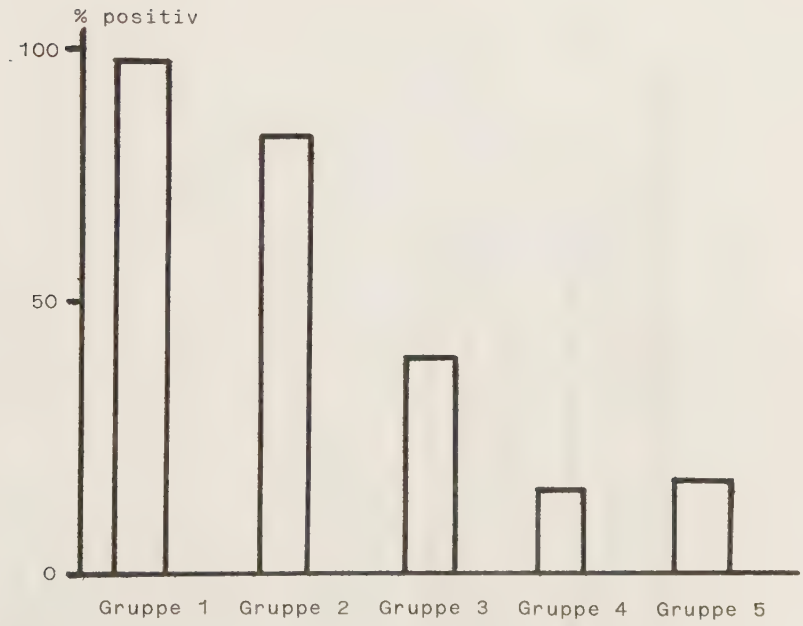


Abb. 8:
Kulturergebnisse bei Zusatz von GasPak^{R}.

Nach 24stündiger Inkubation bei 37^{o}C waren mit GasPak^{R} versehene Röhrchen zu 97,3 % positiv, bei über vier Fünftel der beimpften Röhrchen war eine massive Koloniebildung zu beobachten. Im Vergleich hierzu lag die Positivrate der bei Zimmertemperatur gelagerten, aber ansonsten in gleicher Weise behandelten Medien (Gruppe 2) bei 16,2 %, von denen der überwiegende Anteil (10 von 12) nur vereinzelte Koloniebildung aufwies. Würde diese letztere Gruppe anschliessend mit 37^{o}C weiter inkubiert, wie es bei der Gruppe 3 der Fall ist, ließe sich immerhin die Positivrate noch auf 82,4 % steigern. Der Anteil der nur bei Raumtemperatur gelagerten positiven Kulturen lag bei Verwendung von GasPak^{R} (Gruppen 2 und 4) unter 20 %.

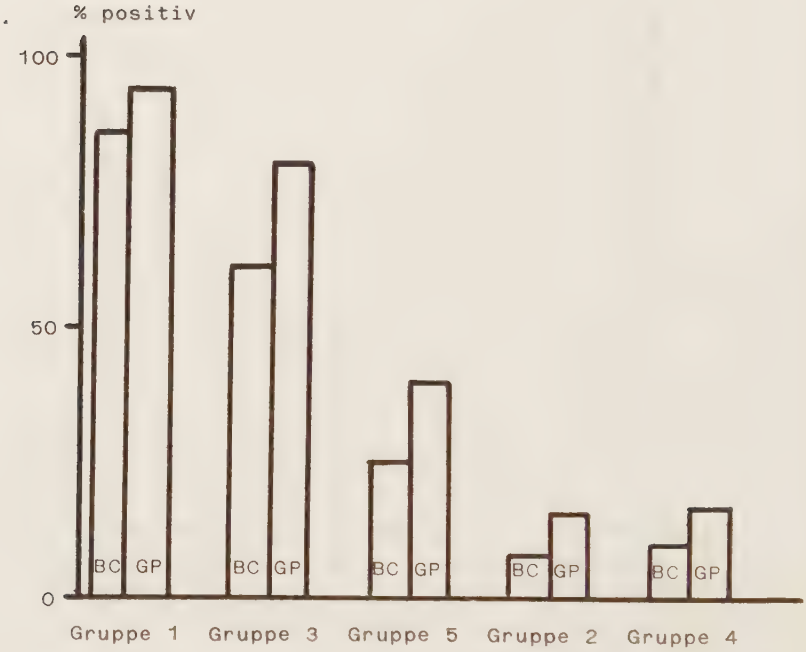


Abb. 9:
Vergleichende Darstellung beider verwendeter CO_2-Entwickler.

In jeder der zu betrachtenden Gruppen lagen die Anzüchtraten der mit GasPak^R versetzten Röhrchen höher als die der mit Citrat-Bicarbonat-Mischung beschickten. Erwartungsgemäß wurden bei 24 h und 37^oC Bebrütungstemperatur die meisten positiven Resultate festgestellt:
Die mit GasPak^R versetzten Kulturen zeigten in 97,3 % der Fälle Neisserienwachstum, während die mit Citrat-Bicarbonat-Gemisch inkubierten Röhrchen nur zu 87,8 % positiv waren.

5. DISKUSSION

5.1. ALLGEMEINE VORBEMERKUNG

In der folgenden Diskussion soll auf die vorangehenden Untersuchungen und ihre Ergebnisse näher eingegangen werden.

Es sollten Aussagen gewonnen werden, in welcher Art bei dieser einfachen und kostengünstigen Methode nach ITANI (23) die Temperatur und die Bebrütungsdauer das Wachstum von Neisseria gonorrhoeae beeinflussen.

Außerdem sollte festgestellt werden, in welchem Maße zwei einfache CO_2-Entwickler im Vergleich miteinander und zur aeroben Inkubation in der Lage sind, eine ausreichend starke Koloniebildung von Neisserien zu beeinflussen.

Das von ITANI beschriebene Verfahren bietet durch seine praxisbezogene Durchführbarkeit dem Arzt, dem ein Speziallabor in unmittelbarer Nähe fehlt, eine Hilfe bei Diagnostik und späterer Kontrolle des Therapieerfolges.

Aufgrund der methodischen Vorüberlegungen ist eine vergleichende Aussage über die Anzüchtrate mit anderen Kulturmedien nicht möglich, da weder ein Kontrollmedium noch Material gonorrhoe-verdächtiger Personen mitgeprüft wurden.

Mit 97,3 % liegen die positiven Resultate jedoch in dem von HEITE (22) postulierten Bereich, der für die Gonorrhoe-Diagnostik gefordert wird.

5.2. ZUR AUSWAHL DES PATIENTENGUTS

Es wurden ausschließlich akute und purulente Fälle zu obigen Untersuchungen herangezogen, weil von jedem Patienten ausreichende und vergleichbare Mengen an Abstrichmaterial auf 15 Kulturröhrchen überimpft werden mußten. Auf die Verwendung von kulturell gewachsenen und gewonnenen Neisserien wurde bewußt verzichtet, weil diese Möglichkeit nicht den Bedingungen der Praxis entsprechen würde. Bei den Patienten hatte keine Behandlung stattgefunden, so daß eine Beeinträchtigung der Anzüchtrate aus diesem Grunde nicht zu erwarten war.

5.3. ZUR GESCHLECHTSVERTEILUNG

Durch die obengenannten Voraussetzungen waren die Patienten in der Regel männlichen Geschlechts. Das Verhältnis Männer zu Frauen betrug etwa 11 : 1. Die Frauen kamen im allgemeinen nicht als Notfallpatienten, weil sie Beschwerden einer akuten Gonorrhoe verspürten, sondern weil sie als Sexualpartner eines akut erkrankten Patienten ebenfalls untersucht und behandelt wurden. Für die Untersuchungen wurden die Portioabstriche verwendet.

5.4. ZUM VERGLEICH DER CO_2-ENTWICKLER

WHERRY et al. (41) berichteten bereits 1918 über die Notwendigkeit einer anaeroben Kultivierung von Neisserien.

Die Angaben über die zur erfolgreichen Inkubation erforderliche Höhe der CO_2-Konzentration reichen von 4 % (23), 5 % (31), bei den meisten Autoren 10 % (2, 7, 33, 42) bis 16 % (9).

Eine Reihe von Untersuchern wenden zur Herstellung dieses CO_2-reichen Milieus das recht einfache Kerzenflammverfahren an (8, 20, 21, 36). Vorteile dieses Verfahrens sind der geringe apparative Aufwand, seine einfache Handhabung und die hohe Sicherheit einer ausreichend hohen CO_2-Konzentration in der Atmosphäre der Kulturplatte. Zudem sind die Kosten dieser Art der CO_2-Entwicklung gering. Als Nachteile können der vermehrte Platzbedarf innerhalb des Brutschrankes und das Absinken der CO_2-Konzentration bei mehrmaligem Öffnen des Inkubationsgefässes beim Eingang neuer Untersuchungsproben angesehen werden (39).

Kohlendioxid-begaste Brutschränke gewährleisten eine hohe Sicherheit der Einhaltung einer vorbestimmten CO_2-Konzentration. Die beimpften Kulturmedien brauchen nicht einzeln mit einem chemischen CO_2-Entwickler beschickt zu werden. Sie eignen sich jedoch kaum für eine Verwendung in der Arztpraxis, da im Vergleich zur Anzahl der anaerob zu kultivierenden Untersuchungsproben sowohl der finanzielle als auch der apparative Aufwand zu hoch erscheint. In der Regel bleiben Kohlendioxid-begaste Brutschränke dem Einsatz in Speziallaboratorien und Kliniken vorbehalten (8).

MARTIN et al. (29) entwickelten mit Hilfe von industriell hergestellten Citrat-Bicarbonat-Tabletten ein einfaches Verfahren zur Erreichung der erforderlichen CO_2-Konzentration, das dem Kerzenflammverfahren in der Kulturausbeute

und der Anzahl der gewachsenen Neisserien-Kolonien ebenbürtig ist. TILLER et al. (39) berichten ebenfalls über gute Ergebnisse bei Verwendung eines selbst hergestellten Citrat-Bicarbonat-Gemisches.

ITANI (23) beschreibt die gute Wirksamkeit der CO_2-Entwicklung mittels GasPak^R-Tabletten-Zusatz auf dem von Kondenswasser befeuchteten, nicht mit Kulturmedium bedeckten Boden des von ihm verwendeten Stuhlröhrchens.

Als Vorteile des chemischen Verfahrens der CO_2-Entwicklung können angesehen werden:
- die Verwendungsmöglichkeit eines für aerobe Kulturen vorgesehenen Brutschrankes,
- der geringe Platzbedarf innerhalb des Inkubators,
- der geringe apparative Aufwand,
- die fehlende Beeinflussung der CO_2-Konzentration bei mehrmaligem Öffnen des Brutschrankes,
- die sichere CO_2-Entwicklung bei bestimmungsgemäßer Handhabung,
- die methodische Einfachheit verbunden mit kostengünstiger Durchführbarkeit.

Nachteilig kann sich die unmittelbare Nähe des CO_2-entwickelnden Agens mit der beimpften Kulturoberfläche auswirken.

In den vorliegenden Untersuchungen sollte die Frage beantwortet werden, ob ein selbst hergestelltes Gemisch aus Natriumhydrogencarbonat und Natriumcitrat im Vergleich mit der oben angegebenen GasPak^R-Methode ähnliche Ergebnisse erbringen kann, um die Bedingungen für die Verwendung in der Arztpraxis zu vereinfachen.

Die Herstellung eines einfachen CO_2-Entwicklers in Form eines Gemisches aus Natriumcitrat und Natriumhydrogencarbonat bereitet keine technischen Probleme, zumal diese Chemikalien in jedem Labor vorhanden sind. Bei sachgemässer Lagerung und Anwendung ist dieses Gemisch in der Lage, ausreichende anaerobe Verhältnisse innerhalb der verwendeten Stuhlröhrchen herzustellen. Da es sich im Gegensatz zum fest gepreßten GasPak^R um einen pulverförmigen Zusatz zur Kultur handelt, ist anzunehmen, daß eine Beeinflussung der Anzüchtrate durch direkten Kontakt mit dem Kulturmedium möglich ist. So kann die unter allen untersuchten Konditionen (Temperatur- und Zeitabhängigkeit) erniedrigte Wachstumsrate in Gegenüberstellung mit den mit GasPak^R beschickten Röhrchen gedeutet werden.

Im optimalen Temperaturbereich (37^{o}C) und 24 Stunden Inkubationszeit lag die Anzüchtrate mit 87,8 % knapp 10 % unterhalb der mit GasPak^R versetzten Röhrchen. Bei letzteren konnte auch eine prozentual höhere Zahl an ausgedehnten Koloniebildungen festgestellt werden.

Von den beiden (= 2,7 %) negativen mit GasPak^R versetzten Kulturen (24 h bei 37^{o}C) ist festzuhalten, daß im ersten Falle die mit Citrat-Bicarbonat-Mischung begaste Kultur zahlreiche peroxidase-positive Kolonien aufwies. Bei dem zweiten Patienten ließen sich unter gleichen Bedingungen nur in der aeroben Kultur vereinzelt peroxidase-positive Kolonien beobachten. Ein falsch positives Ergebnis der mikroskopischen Untersuchung scheidet in beiden Fällen somit aus. Als Ursache für diese scheinbaren falsch negativen Befunde sind Fehler, die bei der Beimpfung auftreten können, anzunehmen. Im ersten Fall liegt der Verdacht nahe, daß

kein oder nur eine unzureichende Menge GasPak^{R} der beimpften Kultur zugesetzt wurde. Im zweiten Fall scheint die Menge an Urethralsekret nicht ausgereicht zu haben. Festzuhalten bleibt, daß diese Fehler vermeidbar sind und durch den Untersucher und nicht durch die Methode bedingt sind.

Die dargelegten Ergebnisse des Vergleichs beider CO_2-Entwickler zeigen auf, daß die selbst hergestellte Citrat-Bicarbonat-Mischung nicht in der Lage ist, eine annähernd hohe diagnostische Treffsicherheit wie GasPak^{R} zu erreichen.

5.5. ZUM TEMPERATUREINFLUß AUF DAS WACHSTUM DER NEISSERIEN-KOLONIEN

ELMROS (16) konnte überlebensfähige Neisserien 24 Stunden nach Benetzung eines Objektträgers mit Urethralsekret und an einem Handtuch bei Raumtemperatur nachweisen. Die Überlebensdauer konnte nach Absenken der Temperatur auf 4^{o}C auf 120 Stunden verlängert werden. Analoge Beobachtungen machte CHATTOPADHAY (12). Er berichtete von Neisserienwachstum aus Harnproben, die 24 Stunden bei 4^{o}C aufbewahrt worden waren. Nach 76stündiger Inkubation des Harnsedimentes bei 37^{o}C unter anaeroben Bedingungen auf Harnkulturplatten konnte eine Gonorrhoe diagnostiziert werden.

FLEGEL et al. (17) untersuchten am Stuart-Transportmedium mit Hilfe von Gonokokken-Reinkulturen die Anzüchtraten bei unterschiedlicher Temperatur und nach verschiedenen Zeit-

intervallen. Sie konnten aufzeigen, daß die optimale Lager- bzw. Transporttemperatur bis zur Überimpfung auf ein Kulturmedium bei + 4°C lag, während die Angehrate bei 37°C sehr gering war.

Vorliegende Untersuchung wurde nicht mit einem zwischengeschalteten Transport-, sondern unmittelbar mit dem Kulturmedium durchgeführt. So ist die Übereinstimmung mit den Ergebnissen von HEISE und KUBAN (21) zu bemerken, die unter aeroben Bedingungen bei inkubiertem Abstrichmaterial nach 24 Stunden bei 37°C 21,2 % positive Nachweise von Neisserienwachstum und bei einer Temperatur von 20°C praktisch keine positiven Resultate mehr erzielten. Bei dieser Untersuchung handelte es sich jedoch um zweifelhafte Problemfälle und nicht um Material, dessen mikroskopische Untersuchung die Diagnose einer Gonorrhoe bereits zuließ. Dadurch sind unsere Ergebnisse von 63,5 % positiver Kulturen bei 24 Stunden Inkubationszeit und 37°C und 5,4 % nach 24 Stunden bei Raumtemperatur unter aeroben Bedingungen sicherlich zu relativieren. Von den letzteren 5,4 % sind außerdem drei von vier positiven Kulturergebnissen in der Gradation III (nur vereinzelte peroxidase-positive Kolonien) anzutreffen.

Die besten Anzüchtraten fanden sich in der Gruppe, deren Kulturen unmittelbar nach Beimpfung mit Urethralsekret und Beschickung mit GasPak^{R} als CO_2-Entwickler 24 Stunden bei einer Temperatur von 37°C bebrütet wurden. Bei 72 (= 97,3 %) der angelegten Proben konnten positive Nachweise erzielt werden. Gleichlautend fand sich unter diesen Bedingungen bei 63 (= 85,1 %) der inkubierten Röhrchen ein massives Wachstum von peroxidase-positiven Kolonien (Gradation I).

Nur 12 (= 16,2 %) positive Resultate wurden erbracht,wenn die Nährböden bei Raumtemperatur 24 Stunden lagerten. Eine anschließende Inkubation von weiteren 24 Stunden bei 37°C würde in dieser Gruppe die Positivrate auf 61 (= 82,4 %) ansteigen lassen (s. Gruppe 3).

Die Intensität der Koloniebildung fällt hier jedoch deutlich zugunsten der Kategorie II und III ab. Völlig unzureichende Ergebnisse wurden erzielt, wenn die Lagerzeit bei Raumtemperatur auf 48 Stunden verlängert wurde, bevor eine 24stündige Inkubation bei 37°C erfolgte. Nicht mehr als 30 (= 40,5 %) der untersuchten Kulturen ließen den Nachweis von Neisserien zu.

Die Anzüchtergebnisse der mit Citrat-Bicarbonat-Gemisch begasten Kulturröhrchen ließen ein gleichartiges Verhalten in bezug auf Dauer und Inkubationstemperatur erkennen. Nur lagen die Anzüchraten innerhalb der jeweiligen Gruppen, wie bereits berichtet, prozentual deutlich unter denen der GasPak^{R}-Röhrchen.

Zur Temperaturempfindlichkeit der Neisserien ist in unserem Falle zu sagen, daß eine Lagerung bzw. ein Transport der beimpften Kulturen bei Raumtemperatur nicht erfolgen sollte, sondern eine sofortige Inkubation bei einer Temperatur von 37°C die beste Gewähr dafür bietet, die gute diagnostische Aussagekraft der von ITANI beschriebenen Methode zu gewährleisten.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Anhand einer einfachen Methode der Neisserien-Anzüchtung wurden zwei CO_2-Entwickler miteinander verglichen und der Einfluß der Inkubationstemperatur und der Lagerungszeit untersucht.

Als Untersuchungsgut diente purulentes Urethralsekret von 74 Patienten.

Es konnte nachgewiesen werden, daß der industriell hergestellte CO_2-Entwickler (GasPak^R) einem selbst angefertigten Natriumbicarbonat-Natriumcitrat-Gemisch unter allen Inkubationsbedingungen überlegen war.

Die Anzüchtraten von Neisserien lagen mit 97,3 % im Bereich guter diagnostischer Aussagekraft, wenn die Kulturröhrchen sofort bei 37^{o}C für 24 Stunden mit GasPak^R als CO_2-Entwickler inkubiert wurden. Eine Lager- bzw Transportzeit von 24 Stunden und länger beeinflußte das Wachstum der Neisserien erheblich und führte zu deutlich schlechteren Ergebnissen.

7. L I T E R A T U R

1. AMIES, C.R.; GARABEDIAN, M.:
An Easily Prepared Selective Medium for the Cultivation of Neisseria Gonorrhoeae.
Brit. J. vener. Dis. 43, 137-139 (1967)

2. BARTHELMES, H.; HELMKE, F.:
Zur Frage der Wirksamkeit von Polymyxin B^{R} in Selektivnährböden für Neisseria gonorrhoeae.
Derm. Mschr. 159, 944-947 (1973)

3. Bericht über die
soziale Weltsituation 1967.
Kommission für soziale Entwicklung des Wirtschafts- und Sozialrats der Vereinten Nationen.
Today's V.D. Control. Problem 1969, p. 36

4. Bericht über eine
Umfrage bei Gesundheitsämtern zum Auftreten von Geschlechtskrankheiten.
Z. Haut- u. Geschl.-Kr. 46, 857-860 (1971)

5. BIENER, K.:
Geschlechtskrankheiten im Jugendalter - Epidemiologie und Praevention.
Z. Haut- u. Geschl.-Kr. 47, 415-421 (1972)

6. BRITISH COOPERATIVE CLINICAL GROUP:
Homosexuality and Venereal Disease in the United Kingdom.
Brit. J. vener. Dis. 49, 329-334 (1973)

7. BROWN, J.D.:
Modified Transport and Growth Medium for the Cultivation of Neisseria Gonorrhoeae.
Brit. J. vener. Dis. 50, 199-201 (1974)

8. BUCK, A.; HEITE, H.-J.; THOMANN, W.:
Probleme der mikrobiologischen Diagnostik bei der Gonorrhoe.
Z. Haut- u. Geschl.-Kr. 52, 4-6 (1977)

9. CHACKO, C.W.; NAIR, G.M.:
Chacko-Nair Egg-Enriched Selective Medium in the Diagnosis of Pathogenic Neisseriae.
Brit. J. vener. Dis. 44, 67-71 (1968)

10. CHAN, K.; WISEMAN, G.M.; CAIRD, J.D.:
Cultivation of Type 1 N. Gonorrhoeae in Liquid Media.
Brit. J. vener. Dis. 51 (1975)

11. CHAPEL, T.A.; SMELTZER, M.:
Culture of Urinary Sediment for the Diagnosis of Gonorrhoea in Women.
Brit. J. vener. Dis. 51, 25-27 (1975)

12. CHATTOPADHAY, B.:
Gonorrhoea Presenting as "Sterile" Pyuria.
Brit. med. J. 281, 841-842 (1980)

13. DANIELSSON, D.; JOHANNISSON, G.:
Culture Diagnosis of Gonorrhoea.
Acta derm.-venerol. (Stockh.) 53, 75-80 (1973)

14. DELUNE, H.:
Epidemiological Trend of Gonorrhoea in Recent Years.
Brit. J. vener. Dis. 47, 4-6 (1971)

15. EAVES, J.A.:
Studies on Neisseria Gonorrhoeae Cultured in Liquid Medium.
Brit. J. vener. Dis. 54, 160-164 (1978)

16. ELMROS, T.:
Survival of Neisseria Gonorrhoeae on Surfaces.
Acta derm.-venerol. (Stockh.) 57, 177-180 (1977)

17. FLEGEL, P.; REITZIG, B.; HEISE, H.:
Über die Relation von Zeit und Temperatur bei der Verwendung eines Transportmediums zur Gonorrhoe-Diagnostik.
Derm. Mschr. 162, 230-237 (1976)

18. GAVRILESCU, M.; LAZAR, M.; POROJAN, I.; CIRCIUMARESCU, T.:
Long-Term Cultivation of N. Gonorrhoeae in Tissue Culture.
Brit. J. vener. Dis. 42, 171-174 (1966)

19. GROßSCHUPFF, E.; KÜCHLER, R.; LANGMAAK, H.:
Die Wirkung der Lagerungszeit und Lagerungstemperatur auf die Anzüchtung von Krankheitserregern aus Liquoid®-Blut-Gemischen.
Dt. med. Wschr. 98, 2083-2085 (1973)

20. HEIMANS, A.L.:
Culture of Gonococci from the Rectum on Thayer and Martin's Selective Medium.
Dermatologica 133, 319-324 (1966)

21. HEISE, H.; KUBAN, M.C.:
Was vermag die Gonokokken-Kultur zu leisten?
Derm. Mschr. 158, 421-426 (1972)

22. HEITE, H.-J.; THOMANN, W.:
Diagnose und Heilungskriterien bei der Gonorrhoe in der Praxis.
Z. Haut- u. Geschl.-Kr. 52, 15-16 (1977)

23. ITANI, Z.S.:
Neisseria-Gonorrhoeae-Züchtung: Entwicklung einer vereinfachten Methode.
Dermatologica 154, 273-276 (1977)

24. JEPHCOTT, A.E.:
Preliminary Study of Colony Type Stability of Neisseria Gonorrhoeae in Liquid Culture.
Brit. J. vener. Dis. 48, 369-375 (1972)

25. JEPHCOTT, A.E.; RASHID, S.:
Improved Management in the Diagnosis of Gonorrhoea in Women.
Brit. J. vener. Dis. 54, 155-159 (1978)

26. KIRALY, K.:
Epidemiologie der Syphilis und Gonorrhoe im Weltmaßstab.
Derm. Mschr. 160, 609-613 (1974)

27. KOUSA, M.; RENKONEN, O.V.; KLISTALA, U.; LASSUS, A.:
Transgrow (Clinicult) in the Laboratory Diagnosis of Gonorrhoeae.
Brit. J. vener. Dis. 49, 450-451 (1973)

28. LUGER, A.F.:
Problems Concerning Gonorrhoea in Austria.
Brit. J. vener. Dis. 47, 378 (1971)

29. MARTIN, J.E.; ARMSTRONG, J.H.; SMITH, P.B.:
New System for Cultivation of Neisseria Gonorrhoeae.
Appl. Microbiol. 27, 802-805 (1974)

30. MARTIN, J.E. jr.; PEACOCK, W.L. jr.; THAYER, J.D.:
Further Studies with a Selective Medium for Cultivating Neisseria Gonorrhoeae.
Brit. J. vener. Dis. 41, 199-201 (1965)

31. OLMOS, L.
Degeneration of Gonococcus (in Various Media).
Arch. Derm. Res. 256, 305-317 (1976)

32. OLMOS, L.; BERGUES, J.P.; ELLENA, V.; VIENOT, M.; LAUGIER, P.:
Essai du Milieu de Culture "Microcult GC" pour le d'Epistage des Gonococcies.
Dermatologica 155, 224-228 (1977)

33. PEKOWSKI, M.; SZYSZMAR, B.:
Ein neuer, agarfreier, fester Eiernährboden für Neisseria gonorrhoeae.
Derm. Mschr. 158, 249-254 (1972)

34. REYN, A.; BENTZON, M.W.:
Comparison of a Selective and a Non-Selective Medium in the Diagnosis of Gonorrhoea to Ascertain the Sensibility of Neisseria Gonorrhoeae to Vancomycin.
Brit. J. vener. Dis. 48, 363-368 (1972)

35. SETH, A.:
Use of Trimethoprim to Prevent Overgrowth by Proteus in the Cultivation of Neisseria Gonorrhoeae.
Brit. J. vener. Dis. 46, 201-202 (1970)

36. SILVER, P.S.; DARLING, W.M.:
Penicillin-Insensitive Gonococci in the Bolton Area. Preponderance in Young Women and Immigrants.
Brit. J. vener. Dis. 47, 367-372 (1971)

37. STOLZ, E.; SCHULLER, J.:
Gonococcal Oro- and Nasopharyngeal Infection.
Brit. J. vener. Dis. 50, 104-108 (1974)

38. THAYER, J.D.; MARTIN, J.E.:
A Selective Medium for the Cultivation of N. Gonorrhoeae and N. Meningitides.
Publ. Health Rep. (Wash.) 79, 49 (1964)

39. TILLER, F.W.; ROTT, G.:
Ein einfaches Verfahren zur Inkubation von Gonokokken-Kulturen.
Derm. Mschr. 165, 139-140 (1979)

40. WALLIN, J.:
Sexually Transmitted Diseases. The Present Situation in Sweden.
Brit. J. vener. Dis. 54, 24-27 (1978)

41. WHERRY, W.B.; OLIVER, W.W.:
Adaptation to Certain Tensions of Oxygen as Shown by Gonococcus and Other Parasitic and Saprophytic Bacteria.
J. Infect. Dis. 19, 288-298 (1916)

42. YOUNG, H.; PATERSON, I.C.; McDONALD, D.R.:
Rapid Carbohydrate Utilization Test for
the Identification of Neisseria Gonorrhoeae.
Brit. J. vener. Dis. 52, 172-175 (1976)

D A N K S A G U N G E N

Herrn Prof. Dr. Dr. A. Greither danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an seiner Klinik durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. Z. Itani danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, für die vielfältigen Anregungen sowie für die Hilfeleistung bei der Abfassung dieser Arbeit.

L E B E N S L A U F

Am 15. Mai 1949 wurde ich als zweites Kind des Postbeamten Wilhelm Hunloh und seiner Ehefrau Maria, geb. Herring, in Bockum-Hövel geboren.

Von 1955 bis 1959 besuchte ich die Volksschule an der Aachener Straße in Düsseldorf und von 1959 bis 1968 das neusprachliche Geschwister-Scholl-Gymnasium.

Nach einem zweijährigen Praktikum von 1968 bis 1970 legte ich das Vorexamen im Fach Pharmazie ab und arbeitete anschließend als Vorexaminierter in öffentlichen Apotheken in Düsseldorf.

Zum Wintersemester 1971/72 begann ich das Studium der Medizin an der Universität Düsseldorf und legte im Frühjahr 1974 das Physikum ab.

Die ärztliche Prüfung bestand ich im Mai 1978.

Seit dem 4. Juni 1978 bin ich an der Universitäts-Hautklinik unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. A. Greither als wissenschaftlicher Assistent tätig.

Diese Ausbildung wurde durch den Grundwehrdienst bei der Deutschen Bundeswehr von April 1981 bis Juni 1982 unterbrochen.